Zeitschrift: Archives des sciences [1948-1980]

Herausgeber: Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève

Band: 24 (1971)

Heft: 2

Artikel: Recherches taxonomiques et biologiques sur la famille des Dioscoréacées. I. Les protéines des graines de quatre espèces de Dioscorea d'Afrique occidentale : méthodologie et résultats systématiques

Autor: Miège, Marie-Noëlle / Miège, Jacques / Ruchti, Andréa

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-739699

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 15.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

RECHERCHES TAXONOMIQUES ET BIOLOGIQUES SUR LA FAMILLE DES DIOSCORÉACÉES
I. LES PROTÉINES DES GRAINES DE QUATRE ESPÈCES DE *DIOSCOREA* D'AFRIQUE OCCIDENTALE: MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS SYSTÉMATIQUES

PAR

Marie-Noëlle MIÈGE et Jacques MIÈGE
avec la collaboration technique de Andréa RUCHTI et Heidrun BODE

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION 179

II. IMPORTANCE DES MODALITÉS D'EXTRACTION 180

1. *Isolement des albumines et des globulines* 180
2. *Analyse des extraits bruts* 182

III. CHOIX D'UNE TECHNIQUE ÉLECTROPHORÉTIQUE 183

IV. ANALYSE DES PROTÉINES 184

1. *Microélectrophorèse en gel d'agarose* 186

a. Déductions générales 188
b. Déductions taxonomiques 193

2. *Electrophorèse en gel de polyacrylamide* 195

V. CARACTÈRES DIVERS ET BILAN D'UNE EXTRACTION EXHAUSTIVE 196

VI. REGROUPEMENT ET INTERPRÉTATION DES DONNÉES 198

1. *Caractères fournis par l'analyse électrophoritique en gel d'agarose* 198
2. *Caractères fournis par l'analyse électrophorétique en gel d'acrylamide* 201
3. *Caractères divers* 201

VII. CONCLUSIONS 204

VIII. BIBLIOGRAPHIE 205

Résumé

Le but de ce travail est de préciser le statut taxonomique des espèces examinées du genre *Dioscorea* en faisant appel aux caractères, jusqu'ici inexploités, que fournit l'étude biochimique des graines. 154 caractères sont établis, la plupart sont fournis par l'analyse électrophorétique des protéines solubles et, en particulier, par la connaissance des propriétés enzymatiques de ces protéines. En outre, pour permettre l'incorporation de données futures à ces premiers résultats, une étude approfondie des conséquences de chaque particularité technique a été réalisée. Les précisions apportées ici permettront, les connaissant, d'annuler les effets des facteurs exogènes susceptibles de modifier les caractères analysés, en particulier les diagrammes électrophorétiques.

Les quatre Dioscorées étudiées ici se révèlent assez éloignées les unes des autres. Bien que classées dans un même genre, ces espèces ont entre elles des coefficients de similitude ne dépassant pas 36% et descendant aussi bas que 18%. Ces caractères chimiques assez éloignés renforcent leur position, établie sur les caractères classiques habituels, dans quatre sections différentes. Les limites de ces sections seront précisées lorsque les autres membres de la famille auront été étudiés.

Summary

The aim of this study is to classify the taxonomic status of the species of the genus *Dioscorea*, making use of the until now unexploited characters, which are provided by the biochemical study of the seeds. 154 characters are drawn up, most of them supplied by the electrophoretic analysis of the soluble proteins, and particularly by a knowledge of the enzymatic properties of these proteins.

Furthermore, in order to allow for the incorporation of future data into these first results, a thorough study is undertaken of the consequences features. Information carried here will allow for the suppression of exogeneous factors capable of altering the analysed characters, and electrophoretic diagrams in particular.

The four *Dioscorea* studied here are fairly distinct from each other though classified in the same genus, these species have between them similitude coefficients not higher than 36% and as low as 18%.

These chemical characteristics, rather remote from the usual classical data, confirm the position of the species in four different sections. The limits of these sections will be elucidated after the study of the other members of the family.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit setzt es sich zum Ziel, die systematische Stellung der untersuchten *Dioscorea*-Arten aufzuklären. Sie benützt zu diesem Zweck die biochemischen Merkmale der Samen, die bisher noch nicht verwendet wurden. 154 Merkmale wurden ausgewertet, die zumeist durch Protein-Elektrophorese, insbesondere durch die Untersuchung der enzymatischen Eigenschaften der Proteine, gewonnen wurden. Um den Vergleich künftiger Ergebnisse mit diesen ersten Resultaten zu erleichtern wurde der mögliche Einfluss jedes einzelnen Schrittes der Untersuchungstechnik eingehend geprüft: Diese Prüfung soll es gestatten die Verfälschung der Untersuchungsergebnisse, insbesondere der Elektrophorese-Diagramme, durch exogene Faktoren zu erkennen und damit auszuschalten.

Die vier untersuchten Arten erweisen sich als recht verschieden. Obschon sie zur selben Gattung gehören, liegt der Anteil gemeinsamer Merkmale bei paarweisem Vergleich sehr niedrig: nicht über 36%, in einem Fall gar nur bei 18%. Die Verschiedenheit der chemischen Merkmale stützt die Zuordnung dieser Arten zu vier verschiedenen Sektionen, die aufgrund klassischer Kriterien vorgenommen wurde. Die biochemische Untersuchung weiterer Dioscoreaceen-Arten wird eine genauere Abgrenzung dieser Sektionen gestatten.

I. INTRODUCTION

Dans le cadre des travaux que nous poursuivons sur la famille des Dioscoréacées, nous avons entrepris l'étude chimiotaxonomique de ses représentants. Les recherches effectuées portent principalement sur la comparaison des protéines et en particulier des enzymes des diverses espèces. Vingt sont connues en Afrique occidentale. Cet

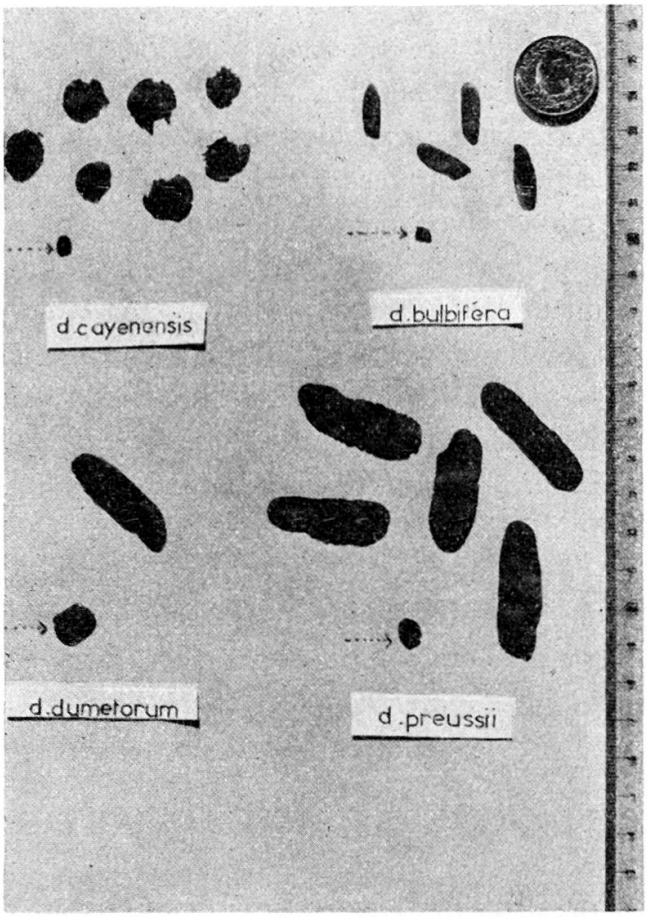

FIG. 1. — Graines des quatre espèces de Dioscorées.

article concerne quatre d'entre elles. D'autres taxons, d'importance hiérarchique variable (espèces, sous-espèces, variétés cultivées d'origines géographiques variées) sont actuellement en cours d'analyses. Au fur et à mesure de l'état d'avancement des observations, leur statut taxonomique sera précisé et les affinités seront de mieux en mieux dégagées entre les membres constituants de la famille. Parallèlement, et sur les mêmes lots, sont effectués les comptages chromosomiques ainsi que la culture en

* Les illustrations ont été exécutées par Mlle Saskia Wickström. Nous remercions très vivement M. Dumont, Directeur du Centre de recherches de Bouaké, M. Vandevenne du même Centre ainsi que la Direction de l'IRAT d'avoir bien voulu nous procurer une grande partie de ce matériel.

serre pour les espèces tropicales, en pleine terre pour celles de régions tempérées, de manière à s'assurer de la détermination exacte des plantes.

Les quatre espèces, prétexte de cette note, ont été choisies de telle façon qu'elles appartiennent à des sections différentes, bien caractéristiques. Ce sont:

Dioscorea bulbifera L . . . . . .sect. Opsophyton
Dioscorea dumetorum (Kunth) Pax. . . . . .sect. Lasiophyton
Dioscorea Preussii Pax . . . . . .sect. Macrocarpaea
Dioscorea cayenensis Lam . . . . . .sect. Enantiophyllum

Nous rappellerons que les trois premières sections sont caractérisées par des tiges volubiles sinistrorses et des capsules allongées alors que la dernière possède des tiges volubiles dextrorses et des capsules aussi larges ou plus larges que longues. *D. Preussii* se distingue par ses graines ailées aux deux extrémités. *D. bulbifera et D. dumetorum* ont des graines avec une aile prolongée seulement vers le bas (fig. 1). Mais, si les deux premières espèces présentent des feuilles à limbe entier cordiforme, la dernière, comme d'ailleurs les autres représentants de la section, sont facilement reconnaissables à leurs feuilles composées palmées. Ce caractère, ajouté à d'autres qui leur sont particuliers, avait fait ériger la section Lasiophyton en un genre spécial, le genre *Helmia*, par Kunth. Quant au *D. cayenensis*, igname largement cultivée et répandue en Afrique noire, ses graines portent une aile plus ou moins circulaire.

Les graines ont jusqu'ici constitué l'essentiel de notre matériel de travail. C'est à partir de leurs farines qu'ont été établis protéinogrammes et enzymogrammes. Cependant, une recherche similaire débute en utilisant les bulbilles et les tubercules. Nous pourrons procéder ainsi à des comparaisons fructueuses et rechercher également si des différences existent entre individus mâles et femelles.

II. IMPORTANCE DES MODALITES D'EXTRACTION

1. Isolement des Albumines et des Globulines

Deux modes d'isolement des familles protéiques intéressantes chez les graines (les albumines qui contiennent la majorité des enzymes et les globulines qui représentent les réserves) sont possibles: la *dialyse directe* des extraits salins, *la dialyse précédée de précipitation* par saturation des extraits à l'aide du sulfate d'ammonium. (Nous écartons pour cette première étude l'isolement des protéines selon leur poids moléculaire par tamisage moléculaire sur résine Sephadex des extraits bruts; cette technique sera comparée à celle qui fait intervenir la dialyse dans le prochain travail).

Le second type de dialyse présente l'avantage de débarrasser immédiatement les extraits de tout ce qui n'est pas protéique et, en outre, de suivre très efficacement les progrès de la dialyse et de l'arrêter dès qu'il n'existe plus de traces de sel d'ammonium dans les dialysats (le test de Nessler est très sensible), ce qui est très rapi-

ment obtenu par électrodialyse. Ce procédé est-il toutefois le plus souhaitable? Le relargage n'entraîne-t-il pas de modifications dans la structure des protéines? Pour en juger nous avons confronté les deux méthodes sur les graines des deux espèces *D. cayenensis* (1) et *D. preussii* (4) plus abondamment disponibles. Les protéinogrammes (électrophorétogrammes des protéines par la coloration au noir amide) des albumines et des globulines obtenus dans chacun des cas peuvent être

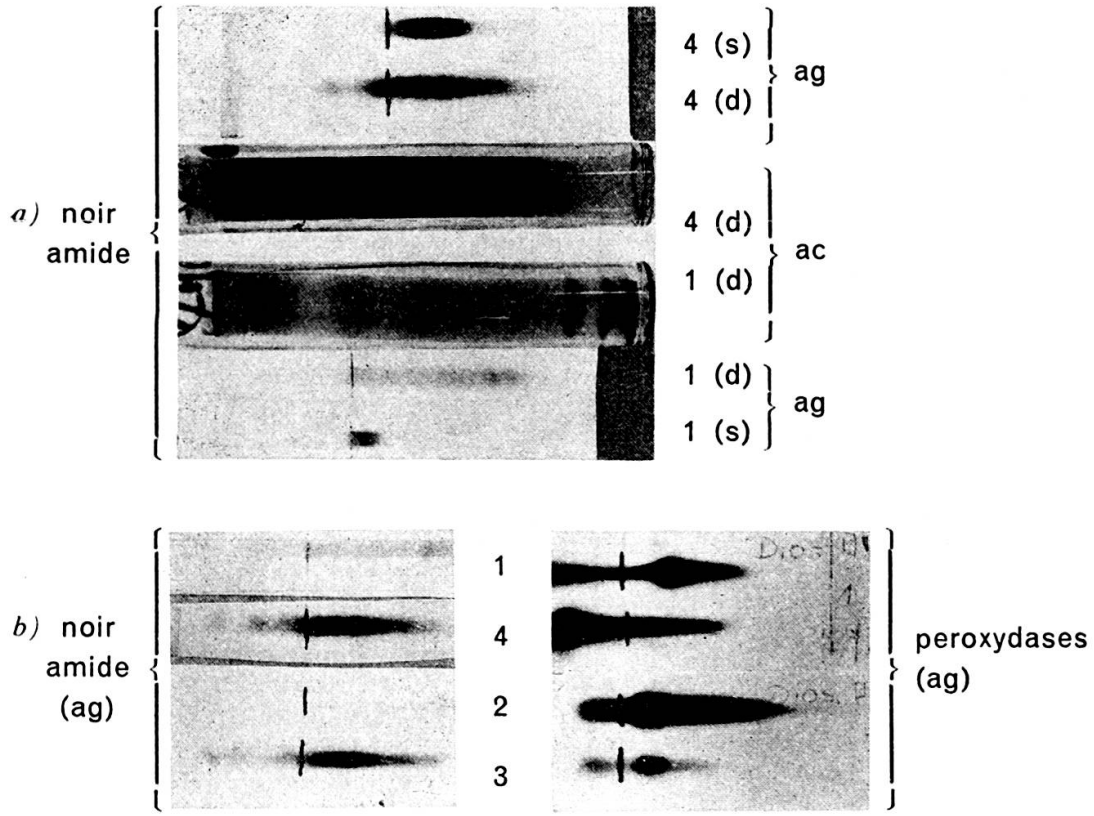

FIG. 2. — Photos de quelques électrophorétogrammes: *a)* électrophorèses sur colonnes de gel de polyacrylamide (ac), et sur lames d'agarose (ag) de *D. cayenensis* (1) et *D. Preussii* (4), coloration au noir amide, *b)* électrophorèses sur lames en gel d'agarose des albumines de *D. cayenensis* (1), *D. bulbifera* (2), *D. dumetorum* (3) et *D. Preussii* (4) (coloration au noir amide et révélation des peroxydases).

comparés figure 3 a et b. (Les électrophorétogrammes sont schématisés dans les figures; à titre indicatif quelques photos des gels colorés sont reproduites figure 2).

Un phénomène intéressant est mis en évidence. Le relargage a compliqué le diagramme des globulines et simplifié celui des albumines. Qu'est-ce que cela signifie? La précipitation préalable des protéines a vraisemblablement entraîné la dissociation de complexes que les globulines formaient entre elles par l'intermédiaire, peut-être, de substances non protéiques comme la phytine. Nous avons eu l'occasion, en d'autres pages, de révéler l'existence de tels complexes protéine-phytine avec les globulines de dolique, complexes assez fluctuants et qui, dans le cas de la dolique, peuvent modifier les caractères de solubilité des globulines.

Quant à la simplification des diagrammes albuminiques, elle reflète une altération sûrement dénaturante.

Une autre singularité est provoquée par le relargage: c'est la disparition totale des globulines catodiques (sur agarose) et presque totale des mêmes albumines.

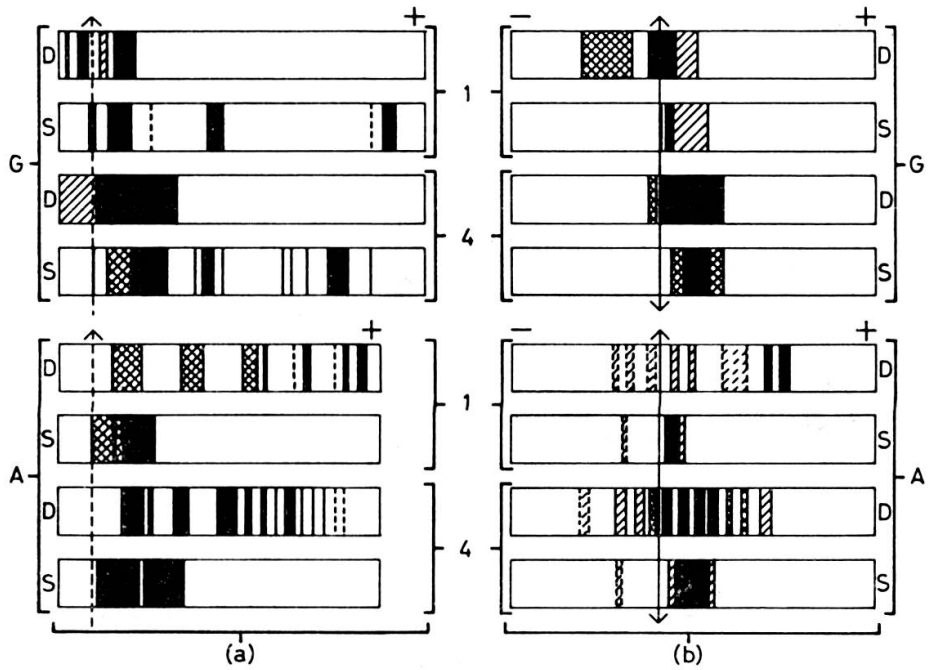

FIG. 3. — Comparaison des protéinogrammes des albumines (A) et des globulines (G) de *D. cayenensis* (1) et *D. Preussii* (4) réalisés après électrophorèse en gel d'acrylamide selon Davis-Ornstein (fig. 3, *a*) et en gel d'agarose (microméthode) (fig. 3, *b*) (pH = 8,6). Chaque diagramme d'une protéine isolée par dialyse directe (d) est mis en parallèle avec celui de la protéine correspondante isolée par dialyse précédée de précipitation par saturation avec le sulfate d'ammonium (s).

Ainsi, la saturation par le sulfate d'ammonium ou bien n'a pas précipité les globulines les plus basiques ou bien les a définitivement insolubilisées.

Cet ensemble de résultats nous conduit à donner la préférence à l'isolement des familles protéiques par dialyse directe des extraits salins. Toutefois, quand la quantité de matériel le permet, un relargage des globulines fournit un complément d'informations en révélant éventuellement les fractions constitutives de macroglobulines complexes.

2. ANALYSE DES EXTRAITS BRUTS

Pour pallier les effets d'une altération éventuelle entraînée par la dialyse, l'analyse électrophorétique des extraits salins bruts est, dans chaque cas, réalisée. Elle complète et contrôle l'analyse séparée des albumines et des globulines; elle ne la remplace pas. En effet, les albumines contiennent la majorité des enzymes en solution pure, c'est-à-dire dépourvue de toute substance étrangère non protéique. Dans ces

conditions, les séparations électrophérétiques sont généralement meilleures et permettent une résolution plus fine de l'ensemble des fractions. En outre, les données fournies par les diagrammes protéiques et enzymatiques des 2 familles séparées multiplient les possibilités d'interprétation des différences qui affectent les protéines des graines de chaque taxon étudié. (Par exemple, si une isoenzyme de distance de migration donnée se trouve être albuminique chez une espèce, globulinique chez une autre, sur le diagramme des extraits bruts on ne notera pas cette différence qui est pourtant très significative et devient évidente lors de l'analyse des familles séparées).

Signalons enfin que les extractions, de même que toutes les autres opérations, ont été réalisées à +2°C. Une extraction à +20°C succédant à celle à basse température ne solubilisait rien ou seulement de très faibles quantités de protéines, aussi avons-nous supprimé cette étape lors des extractions exhaustives.

III. CHOIX DE LA TECHNIQUE ELECTROPHORETIQUE

Les avantages comparés des électrophorèses sur colonnes de gel de polyacrylamide (avec 2 types de gel, l'un permettant une préséparation par l'effet Kohlrausch) d'une part, des microélectrophorèses en gel d'agarose sur lames d'autre part, font peu de doute dans l'esprit de la plupart des chercheurs. Toutes les séparations sont actuellement réalisées en faisant appel à la première méthode (disc electrophoresis) ou éventuellement aux migrations en gel d'amidon. Le dédain général envers les microélectrophorèses en gel d'agarose ne nous paraît pas justifié et n'est pas la conséquence des mauvaises performances de cette dernière technique, dont les avantages, nous allons le voir, sont loin d'être négligeables, du moins en ce qui concerne les protéines de graines.

Nous pouvons comparer sur la figure 4a les protéinogrammes (NA) d'albumines de deux espèces de Dioscorées effectués selon les deux techniques. Sur la figure 4b ce sont les enzymogrammes (peroxydases et phosphatases) qui peuvent être confrontés.

Nous constatons que les protéinogrammes sont effectivement plus résolutifs par la méthode en acrylamide, bien qu'encore les séparations en gel d'agarose, qui ont l'avantage sur la technique en colonne de révéler les fractions catodiques, ne soient pas au total tellement inférieures. En revanche, les enzymes sont nettement mieux révélées en agarose. Lorsque la quantité de matériel disponible permet d'effectuer des migrations sur grandes lames, l'avantage est encore accentué. Mais l'une des supériorités des microélectrophorèses en gel d'agarose est bien précisément de permettre la multiplication des tests enzymatiques à partir d'infimes quantités de protéines. Aussi lorsque nous disposons de quelques grammes de graines de petite taille qui fournissent, après extraction, quelques centaines de mg de protéines

avec lesquels il faut faire des dosages et des analyses l'avantage que présente la microméthode en gel d'agarose devient incomparable.

Nous allons voir d'ailleurs comment, par le jeu des données qualitatives et quantitatives fournies par ces microélectrophorèses, nous nous trouvons rapidement

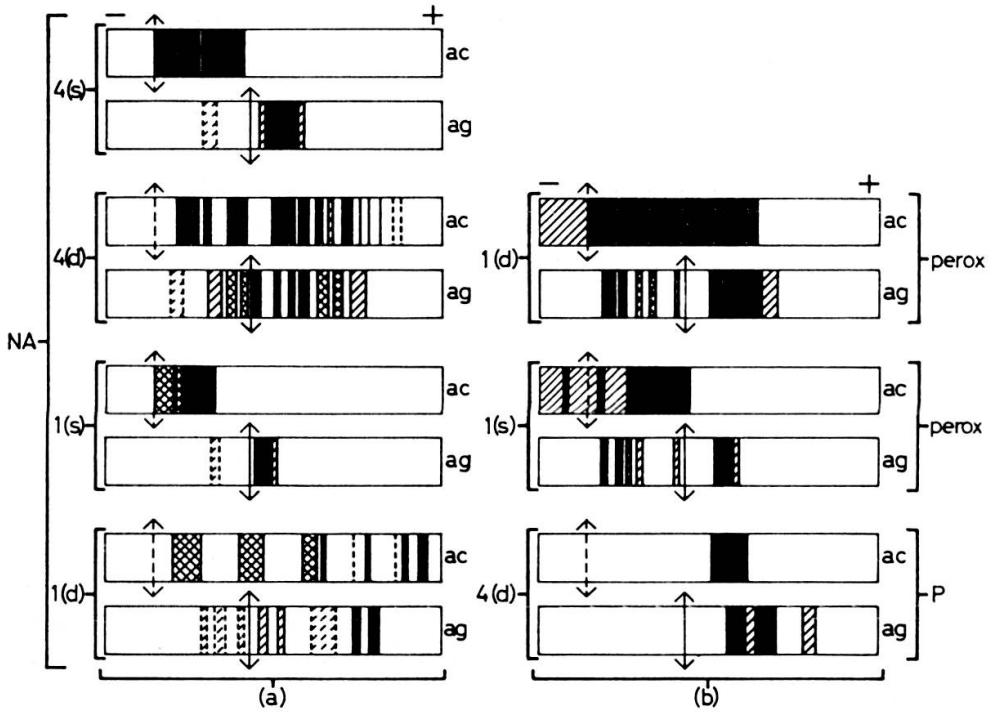

FIG. 4. — Comparaison des diagrammes électrophorétiques (noir amide) (NA), peroxydases (Perox) et phosphatases (P) des albumines de *D. cayenensis* (1) et *D. Preussii* (4) réalisés en gel d'agarose (ag) et en gel de polyacrylamide (ac):

↕ = sur (ag) dépôt de l'échantillon, sur (ac) séparation gel larges pores-gel petits pores.
limite + = position du bleu de bromophénol à la fin de la migration.
s = isolement après précipitation par le sulfate d'ammonium.
d = isolement par dialyse directe.

(Les diagrammes des figures 3-4-5 résultent de migrations différentes d'où les imperceptibles variations qui peuvent s'observer et dont la faible amplitude atteste de la bonne reproductibilité. Ne sont comparés entre eux que les diagrammes ayant même distance de migration du bleu de bromophénol.)

en possession de critères très nombreux pour différencier les protéines des graines étudiées et, par là, déceler des différences génétiques des espèces auxquelles elles appartiennent.

IV. ANALYSE DES PROTEINES

Trois étapes jalonnent cette analyse. Nous établirons et groupons les résultats provenant des données déduites de l'analyse microélectrophorétique en gel d'agarose. Ensuite, seront fournies les données provenant de l'analyse en gel de polyacryla-

mide (technique de Davis-Ornstein (1962) et Davis (1964)). Enfin, nous indiquerons les caractères divers des graines et de la farine qu'elles fournissent ainsi que le bilan d'une extraction exhaustive.

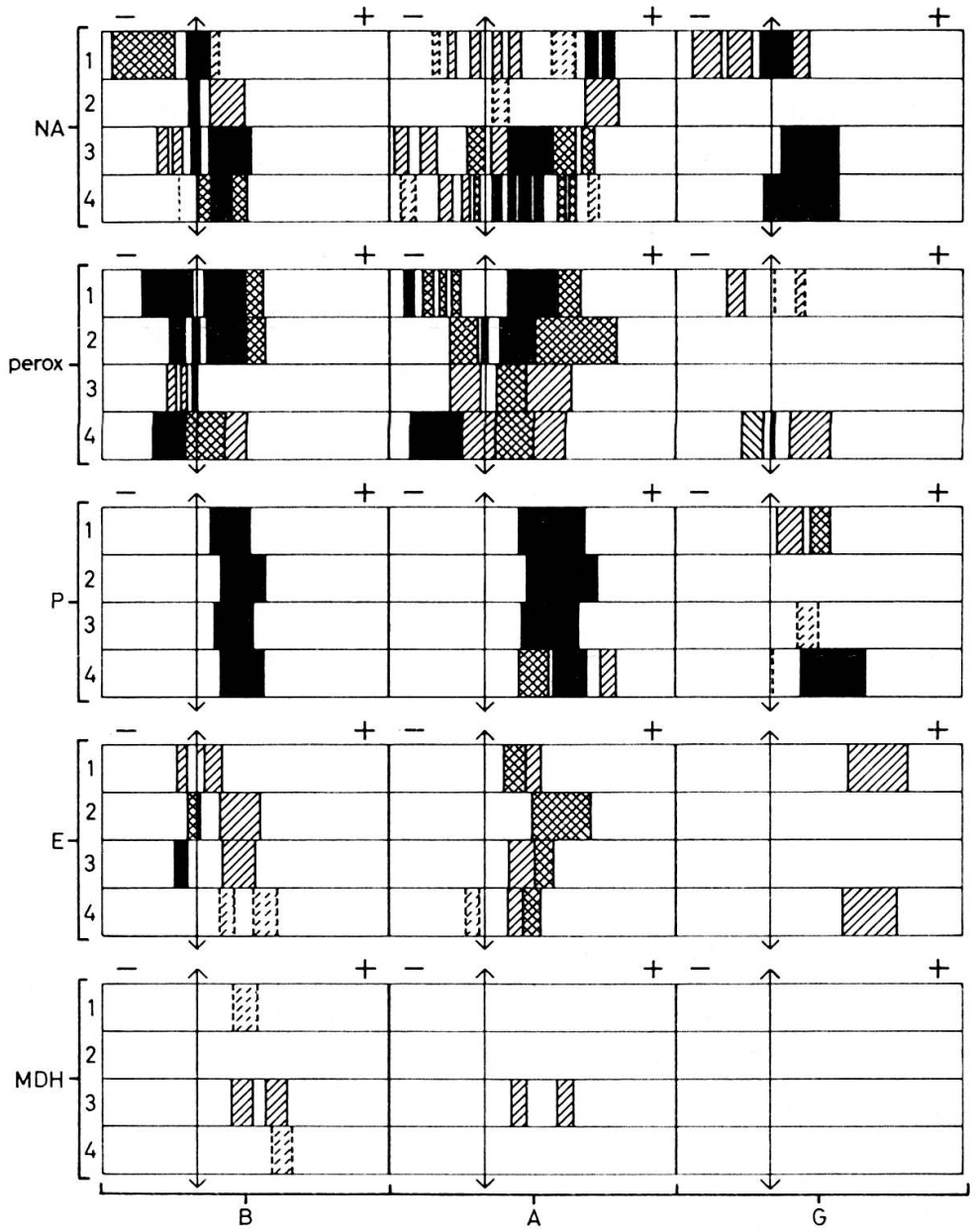

FIG. 5. — Electrophorétogrammes obtenus après migration en gel d'agarose.

En colonne les protéines analysées
- B = extraits bruts
- A = Albumines
- G = Globulines

En rangées les types de diagrammes
- NA = noir amide
- Perox = peroxydases
- P = phosphatases
- E = estérases
- MDH = malique déshydrogénase

Ces trois groupes de données nous permettront, en constatant si elles s'harmonisent ou se contredisent, de discuter de la valeur des divers critères. Le regroupement final de toutes les données conduira à des déductions taxonomiques et à la discusion du statut des quatre espèces étudiées.

1. Microélectrophorèse en gel d'agarose

La figure 5 rassemble tous les électrophorétogrammes (protéinogrammes et enzymogrammes) obtenus à partir des extraits bruts des albumines et des globulines.

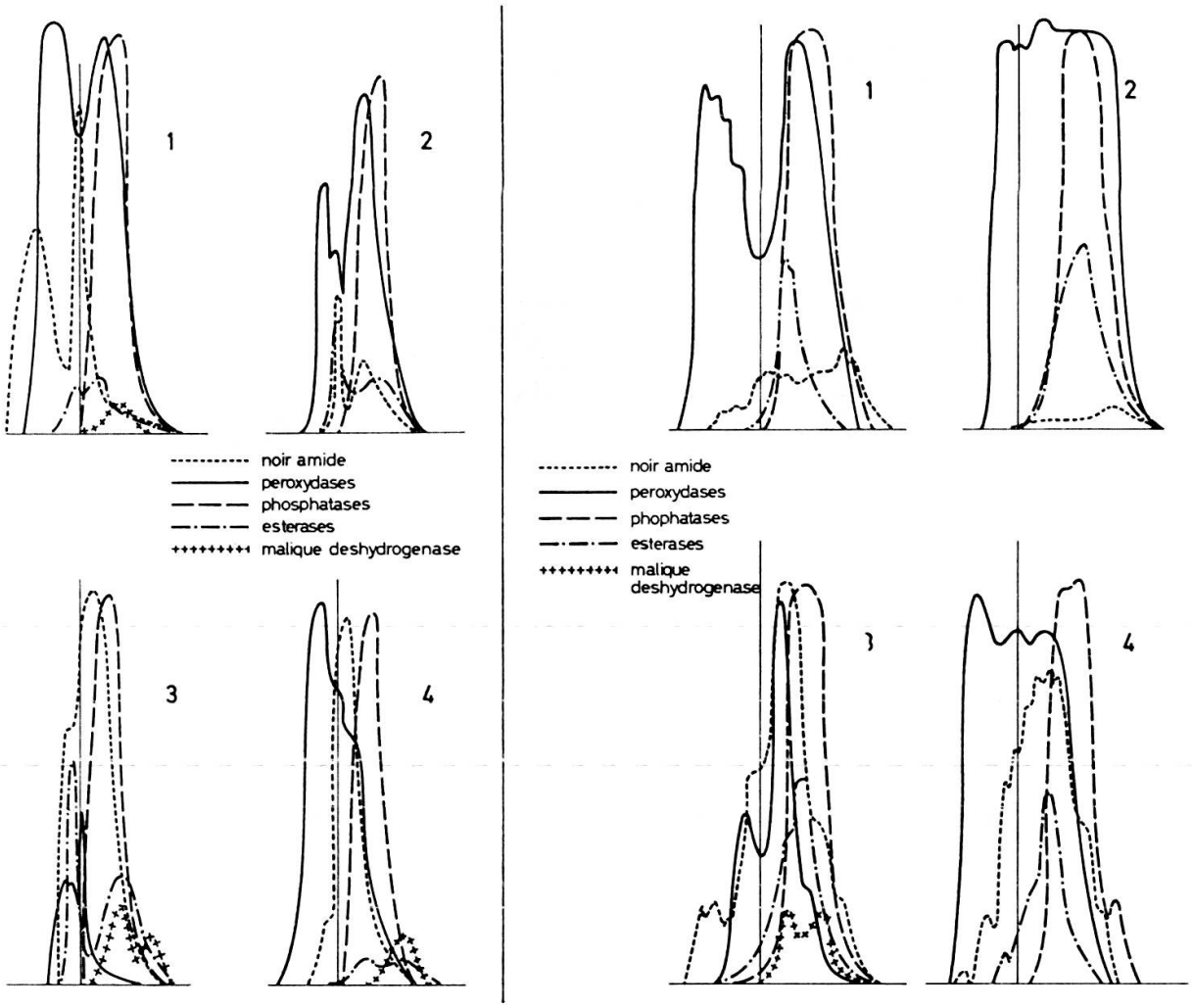

FIG. 6 FIG. 7

FIG. 6. — Diagrammes électrophorétiques combinés de chaque espèce réalisés avec les extraits bruts. Les valeurs fournies par l'intégration des surfaces situées sous les pics de chaque courbe sont rapportées dans le tableau 1.

FIG. 7. — Diagrammes électrophorétiques combinés de chaque espèce réalisés avec les solutions albuminiques. Les valeurs fournies par l'intégration des surfaces situées sous les pics de chaque courbe sont rapportées dans le tableau 1.

Les figures 6 à 11 groupent les courbes densitométriques des diagrammes électrophorétiques obtenus à partir des extraits bruts (fig. 6 et 9), des albumines (fig. 7 et 10) et des globulines (fig. 8 et 11). Rappelons que les albumines et les globulines sont issues de la dialyse directe des extraits salins. Les divers diagrammes (protéinogrammes et enzymogrammes) sont groupés ensemble pour chaque espèce sur les figures 6, 7, 8 alors que les allures différentes fournies par les quatre espèces pour chaque enzymogramme particulier ou pour le protéinogramme peuvent être confrontées figures 9, 10, 11.

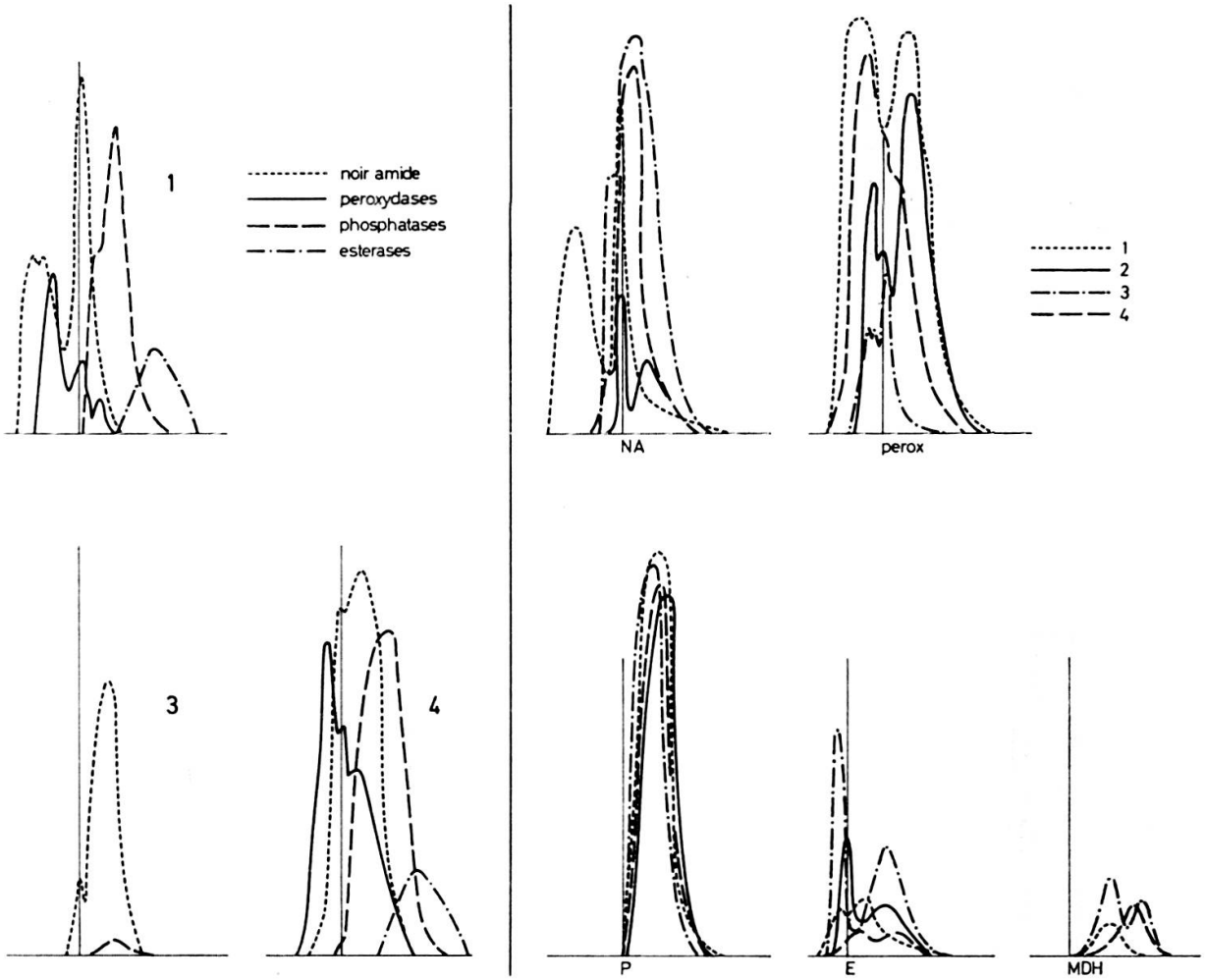

FIG. 8 FIG. 9

FIG. 8. — Diagrammes électrophorétiques combinés de chaque espèce réalisés avec les solutions globuliniques. Les valeurs fournies par l'intégration des surfaces situées sous les pics de chaque courbe sont rapportées dans le tableau 1.

FIG. 9. — Protéinogrammes (NA) et enzymogrammes comparatifs des extraits bruts. NA = noir amide — Perox = peroxydases — P = phosphatases — E = estérases — MDH = malique déshydrogénases.

a) *Déductions générales*

Si on examine comparativement les protéinogrammes et enzymogrammes des extraits bruts d'une part, des albumines et globulines d'autre part, on note une *complexité notablement plus grande*, dans ce dernier cas, de tous les diagrammes. On doit en conclure que les substances non protéiques extraites et dialysables uniformisent la migration électrophorétique. On constate également, étant donnée la forte coloration des enzymogrammes albuminiques, que les activités enzymatiques n'ont pas baissé, ce qui permet d'en déduire que la dialyse n'a pas été dénaturante. (Le protéinogramme de *D. Preussii* est particulièrement significatif à cet égard: alors

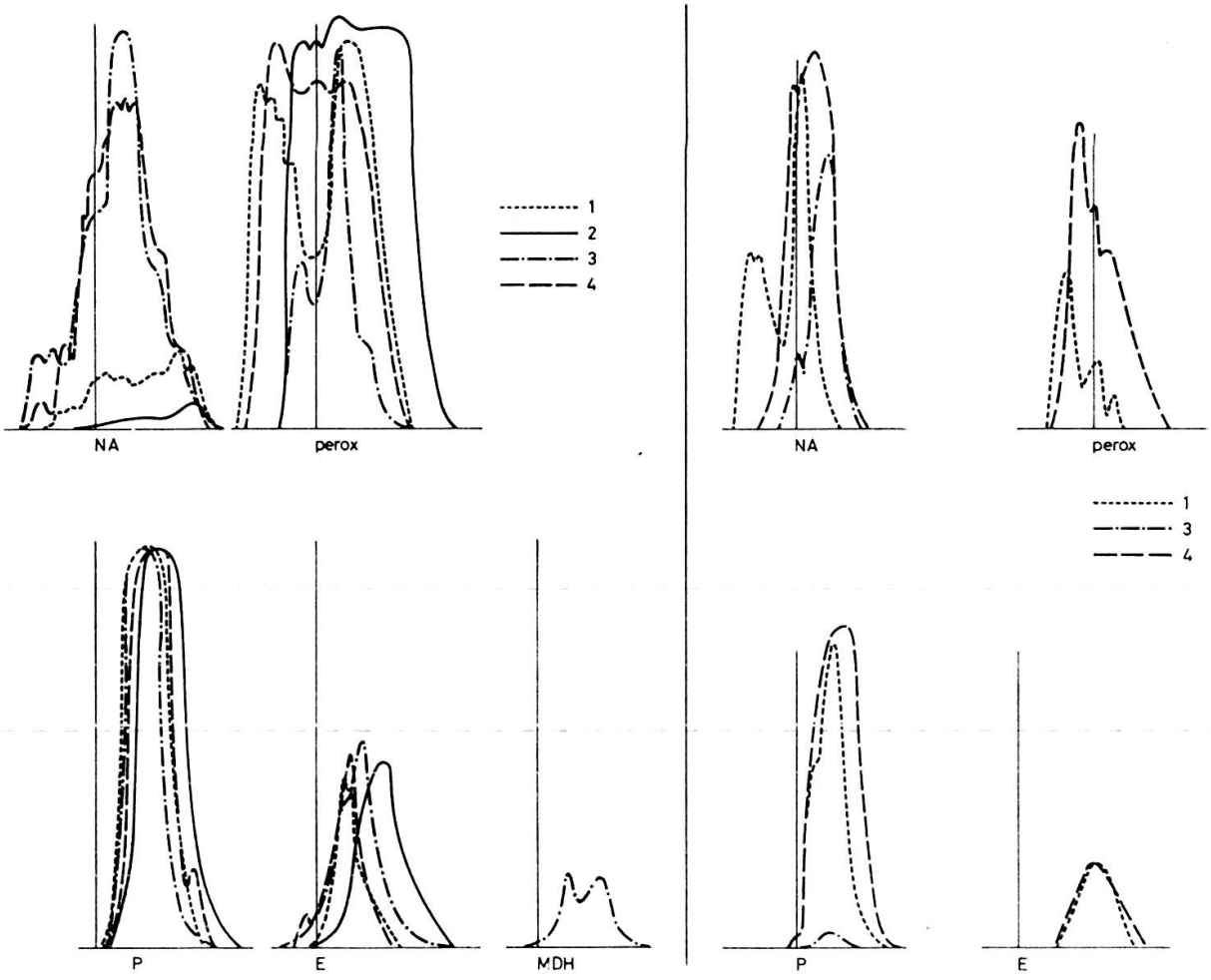

FIG. 10 FIG. 11

FIG. 10. — Protéinogrammes (NA) et enzymogrammes comparatifs des albumines. NA = noir amide — Perox = peroxydases — P = phosphatases — E = estérases — MDH = malique déshydrogénases.

FIG. 11. — Protéinogrammes (NA) et enzymogrammes comparatifs des globulines. NA = noir amide — Perox = peroxydases — P = phosphatases — E = estérases — MDH = malique déshydrogénases.

qu'on dénombre 11 fractions albuminiques et 2 fractions globuliniques, on ne peut distinguer que 2 fractions sur le protéinogramme de l'extrait brut).

La *mobilité électrophorétique*, elle-même, est différente suivant que l'on considère l'extrait brut ou les albumines. Alors que les peroxydases sont visibles à -3, -5 et -8 sur les diagrammes des extraits bruts, elles migrent à -5, -8 et jusqu'à -16 sur les diagrammes des albumines. Rappelons que les conditions électrophorétiques sont rigoureusement normalisées et qu'en outre, les contrôles par migration-parallèles que nous réalisons régulièrement confirment la grande reproductibilité des résultats. Il faut en déduire que les isoperoxydases présentes dans les extraits bruts sont entravées dans leur migration par des substances compagnes dialysables. Il existe de même, chez les globulines, une estérase anodique très mobile (+20) qui n'a pas d'équivalent dans les extraits bruts. C'est l'occasion peut-être de remarquer que la grande majorité des chercheurs qui analysent les protéines végétales se limitent à l'examen des extraits bruts. Si c'est par crainte d'une dénaturation éventuelle que la dialyse est supposée entraîner, nous voyons que cet obstacle n'en est pas un ici et que, pour l'analyse des protéines de graines, la séparation en familles protéiques préalablement à l'analyse électrophorétique est une opération qui parait indispensable.

On pourra objecter que c'est la dialyse qui a provoqué la séparation de macro-enzymes en protomères. Même s'il en était ainsi, ce qui n'est pas prouvé, les renseignements fournis sont de toute façon intéressants; et connaître les protomères doués d'activité enzymatique obtenus dans des conditions normalisées est une source de renseignements sur la physiologie de ces enzymes d'une part, sur des particularités utilisables à des fins taxonomiques d'autre part.

Nous remarquons que les *globulines* ne sont pas des protéines strictement de réserve. Elles ont des activités enzymatiques, plus faibles que celles des albumines mais non négligeables. Rappelons qu'il n'est pas possible d'attribuer ces activités à des impuretés provenant des albumines: les précipités globuliniques issus de la dialyse ont été plusieurs fois lavés dans un grand volume d'eau bidistillée puis centrifugées avant d'être solubilisées à force ionique convenable pour l'analyse électrophorétique. Nous avons déjà eu l'occasion de constater que les substances de réserve des graines ne sont pas de simples matériaux de construction en attente de la germination.

Le tableau 1 groupe toutes les données qualitatives et quantitatives fournies par les diagrammes électrophorétiques, données qui sont interprêtées dans le tableau 2. Ces tableaux font ressortir une apparente anomalie: les *intensités de coloration* au noir amide, sont variables bien que les solutions aient été réalisées avec des concentrations identiques de lyophilisat. En ce qui concerne les solutions d'extraits bruts, on peut imputer les différences aux substances dissoutes non protéiques. En ce qui concerne les albumines ce n'est plus possible et les différences ne peuvent provenir que de différences de solubilité des protéines. Apparemment cependant tout le lyophilisat utilisé s'est bien dissous.

TABLEAU 1

Groupement des données qualitatives et quantitatives fournies par les électrophorèses en gel d'agarose (en colonnes nature des diagrammes, en rangées nature des extraits et numéro des espèces) (La position des pics est appréciée sur les courbes densitométriques ; les surfaces délimitées par ces pics sont intégrées (« integraph Photovolt ») fournissant les chiffres rapportés dans ce tableau)

	NA															Perox												P							E									MDH			
	-18 -16	-11	-8	-4	-2	0	2	5	8	12	16 à 18	22	26	T	-16	-12	-9 -8	-6 -5	-3	0	1	3	7	10	20	T	0	5	10	13	16	25	T	-3	0	4	7	9	11	15	20	T	7	10	18	T
B 1		31				21		2						54			65						60			125			63				63	3		5						8		2		2
B 2						5		10						15					12	5			58			75			52				52		5				10			15				0
B 3			18				60							78				6	4	6						16			52				52	12					14			26		8	4	12
B 4				2			36							38				43		10		30				83			50				50				2			3		5			4	4
A 1		2	2		1		3		3		5	8	5	29	30	15	12	10					80			147				90			90				10	8				18				0
A 2								1				6		7				20		10			90		80	200					95		95							43		43				0
A 3	5	4		6				10	44		10	6		85				15					48			63				85			85				13		18			31	8		12	20
A 4	2		6	4	7		9	15	16	16	12	5		92		60				20			65			145				36	40	4	80	2			6	14				22				0
G 1		16	14			37								67			16				4		2			22		12	26				38								15	15				0
G 2														0												—							—									—				—
G 3								43						43												0			3				3									0				0
						8		76						84				25			4	28				57	2			73			75								15	15				0

ABRÉVIATIONS: B: Extraits bruts — A: Albumines — G: Globulines — 1: *D. cayenensis* — 2: *D. bulbifera* — 3: *D. dumetorum* — 4: *D. Preussii* — NA: noir amide — Perox: peroxydases — P: phosphatases — E: estérases — MDH: malique deshydrogénases.

TABLEAU 2

Interprétation des données quantitatives (les valeurs remarquables sont en caractères gras)

		NA	Perox	P	E	MDH	Activité totale	A/NA : B/NA					Perox	P	Perox	Perox
								Perox	P	E	MDH	Total	Activité totale	Activité totale	P	E
B	1	54	125	63	8	2	198						0,6	0,3	2,0	**15,6**
	2	15	75	52	15	0	142						0,5	0,4	1,4	5,0
	3	78	**16**	52	26	**12**	106						**0,2**	**0,5**	**0,3**	0,6
	4	38	83	50	5	4	142						0,6	0,4	1,6	1,7
B/NA	1	1	2,3	1,2	0,2	0	3,7									
	2	1	5,0	**3,5**	1,0	0	**9,5**									
	3	1	**0,2**	**0,7**	0,3	0,2	1,4									
	4	1	2,2	1,3	0,1	0	3,7									
A	1	29	147	90	18	0	255						0,6	0,4	1,6	8,2
	2	7	200	95	43	0	338						0,6	0,3	2,1	4,7
	3	85	**63**	85	31	**20**	199						**0,3**	0,4	**0,7**	**2,0**
	4	92	145	80	22	0	247						0,6	0,3	1,8	6,6
A/NA	1	1	5	3,1	0,6	0	8,8	2,2	2,6	3,0	—	2,4				
	2	1	**29**	**14,0**	6,0	0	**48,3**	5,8	4,0	**6,0**	—	**5,1**				
	3	1	**0,7**	1,0	0,4	0,2	2,3	3,5	1,4	1,3	1	1,6				
	4	1	1,6	0,9	0,2	0	**2,7**	**0,7**	**0,7**	2,0	—	**0,7**				
G/NA	1	1	0,3	0,5	0,2	0	1,1									
	2	1	—	—	—	—	—									
	3	1	0	0,1	0	0	**0**									
	4	1	0,7	0,9	0,2	0	**1,8**									

C'est le moment de donner quelques précisions sur la *colorabilité* des protéines par le noir amide. Tout d'abord, précisons que l'intensité de coloration est proportionnelle à la concentration en protéines de la solution soumise à l'électrophorèse. En effet, des auteurs (Wieme 1965, François et Rabaey 1958) observent un accroissement linéaire de la surface colorée enregistrée pour une augmentation de concentration, dans les proportions de 1 à 10, en albumine humaine, en transferrine et en γ globuline. Par une autre technique, ils trouvent également une bonne relation linéaire entre les densités optiques des zones colorées et la concentration des solutions analysées en albumine et γ globuline. Par ailleurs, ils montrent que la surface sous un pic enzymatique, après électrophorèse en gel d'agarose, est proportionnelle au logarithme de la concentration de l'enzyme. Cette observation nous autorise à apprécier l'activité enzymatique par l'intensité de coloration des enzymogrammes.

Quant à la diversité des colorations par le noir amide de solutions protéiques de même concentration, que nous constatons ici pour les albumines, elle n'est pas exceptionnelle: Uriel (1958), de même que François et Rabaey (1958), ont constaté chez les protéines sériques, que l'albumine, à concentration égale, fixe 1,8 fois plus de colorant que la γ globuline.

Pour tenter d'expliquer ces différences d'intensité, examinons le mécanisme de la coloration. Le noir amide, comme les autes colorants des protéines utilisés en électrophorèse (Bleu de bromophénol..) est un colorant organique acide qui se lie aux protéines fortement par liaison électrostatique. La coloration a lieu à pH acide, tous les groupements aminés passent à l'état ionisé et les radicaux acides à l'état non ionisé COOH; ce sont alors les radicaux amines ionisés NH_3^+ qui fixent le colorant acide. Est-ce à la différence de teneur des protéines considérées en groupements basiques que l'on doit les différences d'intensité de coloration au noir amide des solutions protéiques de même concentration? On pourrait alors conclure que les albumines les moins colorées sont les plus pauvres en aminoacides basiques. En outre, les albumines sont souvent des glycoprotéines, la proportion variable de glucides liés intervient donc également.

Dans ces conditions, faut-il interpréter les données quantitatives *en référence* à la concentration des solutions protéiques ou à la coloration au noir amide? Si nous étions sûrs qu'aucun autre facteur n'intervienne pour modifier la proportionnalité concentration/coloration, c'est la concentration qui s'imposerait comme référence; dans le cas contraire, la référence à l'intensité de coloration au noir amide est une valeur plus sûre. En outre, dans le cas des globulines et des extraits bruts, la concentration en protéines ne peut être évaluée par le poids de lyophilisat; or une évaluation basée sur un autre critère que le poids (absorption à 280 mμ ou dosage par la technique de Folin par exemple) n'est pas toujours possible (turbidité, faible quantité disponible..) et de plus entachée de relativité puisque là interviennent des radicaux spéciaux.

Aussi, finalement, interprèterons-nous les données en les rapportant successivement aux deux critères de référence.

Précisons les données techniques des solutions protéiques soumises à l'électrophorèse:

Pour les *albumines*: les solutions sont faites à concentration égale en poids de lyophilisat; (le lyophilisat est maintenu sec en présence d'anhydride phosphorique); c'est pour les albumines que le critère concentration pondérale a la plus grande signification.

Pour les *extraits bruts:* les solutions à analyser sont faites, chaque fois que la quantité disponible le permet, avec des quantités de lyophilisat équivalentes en protéines, appréciées après dosage des protéines du lyophilisat par la technique de Folin. Quand ces dosages ont été possibles, le critère de référence « concentration pondérale » sera utilisé parallèlement à celui « intensité de coloration au noir amide ». Dans le cas contraire, ce dernier critère sera la référence quantitative préférentielle (le critère pondéral sera néanmoins intéressant en reflétant la richesse en enzymes d'un même poids de lyophilisat).

Pour les *globulines:* seul le critère « intensité de coloration » sera accessible dans la plupart des cas. Les solutions globuliniques, en effet, souvent fragiles, ne sont pas lyophilisées et sont conservées congelées, après redissolution des précipités de dialyse en solution saline. Il serait possible d'effectuer un dosage puis d'ajuster ces solutions à une concentration équivalente en protéine, mais les faibles quantités de globulines disponibles pour cette présente étude ont conduit à renoncer à cette possibilité d'appréciation quantitative.

Dans toutes les comparaisons quantitatives qui vont suivre, bien entendu les seules valeurs ramenées à un même critère seront confrontées entre elles.

b) *Déductions taxonomiques*

Les principales observations que permettent les données réunies dans les tableaux 1 et 2 se résument ainsi:

1. *L'activité peroxydasique* de *D. dumetorum* (3) est la plus faible, que le critère de référence soit la concentration en protéine ou l'intensité de coloration au noir amide, et aussi bien avec les extraits bruts qu'avec les albumines. Voilà qui singularise considérablement l'espèce en question. L'activité la plus forte, également indépendante du critère en ce qui concerne les albumines, est celle de *D. bulbifera* (2); c'est aussi celle de cette espèce si l'on considère les extraits bruts mais seulement si l'activité est rapportée à l'intensité de coloration. Si l'activité peroxydasique des albumines comme des extraits bruts de *D. bulbifera* devient tellement supérieure à celle des autres espèces lorsqu'elle est exprimée en fonction de la coloration au noir amide, c'est peut-être le reflet d'une pauvreté relative de ces protéines en groupements basiques ou encore l'indice d'une plus forte proportion de glucides ce qui diminuerait leur aptitude globale à fixer le colorant sans modifier l'activité des peroxydases.

2. *Les phosphatases* fournissent un mauvais critère de distinction. Elles sont fort identiques chez les quatre espèces. Nous remarquons cependant quelques singularités: l'activité particulièrement faible de l'extrait de *D. dumetorum* (3) en référence à la coloration ainsi que la considérable supériorité de l'activité des albumines de *D. bulbifera* (2) toujours en référence au noir amide; alors qu'il faut souligner la grande uniformité phosphatasique des albumines ou des extraits bruts exprimée en fonction de la concentration pondérale. Cela est encore la conséquence de la différence de colorabilité globale des albumines des deux espèces concernées.

3. *L'activité peroxydasique particulièrement faible chez D. dumetorum* par rapport à celle des autres espèces (quelle que soit la référence) ne correspond pas à une infériorité générale de tous les systèmes enzymatiques. Ses activités estérasique et deshydrogénasique sont les plus élevées, ce qui atténue l'écart entre l'activité totale de *D. dumetorum* et celle des trois autres dioscorées.

4. *L'activité enzymatique totale*, en référence à la coloration, est, sauf pour une espèce, bien supérieure (2 à 5 fois) pour les albumines que pour les extraits bruts. Cela semblerait indiquer que dans les extraits bruts existent plus de substances protéiques, ou au moins à groupes aminés, non enzymatiques que chez les albumines. Ce qui est logique. L'infraction à cette règle de *D. Preussii* (4) est singulière. Pour expliquer cette exception on peut constater que cette espèce est justement la plus riche en globulines à propriétés enzymatiques.

5. *Les globulines*, qui ont donné des intensités de coloration par le noir amide comparables à celle des diagrammes d'extraits bruts ou d'albumines, manifestent très peu de propriétés enzymatiques. (Mettons de côté *D. bulbifera* (2) qui fut disponible en trop faible quantité pour permettre une concentration suffisante des solutions globuliniques). Il faut cependant souligner les activités relativement importantes des globulines de *D. Preussii* (4).

6. Si l'on considère *chaque activité enzymatique relativement à l'activité totale* révélée ici, on constate que *D. dumetorum* (3) se singularise par ses excès. Cette espèce affiche l'activité peroxydasique relative la plus faible et l'activité phosphatasique la plus forte, que l'on considère les extraits bruts ou les albumines isolément.

7. Si alors on estime les *activités enzymatiques les unes par rapport aux autres*, on constate que l'activité peroxydasique proportionnellement à l'activité phosphatasique est de beaucoup la plus faible chez *D. dumetorum* (3), qu'il s'agisse de l'extrait brut ou des albumines, et la plus forte chez *D. bulbifera* (2) si l'on considère les extraits bruts et *D. cayenensis* (1) s'il s'agit des albumines seules. Cette dernière constatation souligne une fois de plus l'interférence des substances compagnes présentes dans les extraits bruts et qui perturbent l'appréciation des activités enzymatiques.

8. Enfin, *l'activité peroxydasique comparée à l'activité estérasique* manifeste dans les extraits bruts les valeurs les plus diverses: c'est par 26 qu'il faut multiplier la plus faible pour trouver la plus forte. L'isclement des albumines aplanit ces excès; la valeur supérieure, celle de *D. cayenensis* (1), n'est plus que 4 fois supérieure à la valeur minimum, celle de *D. dumetorum* (3) la hiérarchie restant identique dans les deux types de solutions protéiques.

2. Electrophorèses en gel de polyacrylamide

Les protéinogrammes (NA) provenant d'électrophorèses en gel de polyacrylamide d'extraits bruts d'une part, d'albumines et de globulines d'autre part, peuvent être examinés figure 12. On est frappé tout d'abord par leur extrême diversité. En outre, on s'étonne de constater que les diagrammes de l'extrait brut des espèces *D. cayenensis* et *D. Preussii* (1 et 4) ne sont pas la somme des diagrammes albuminiques et globuliniques.

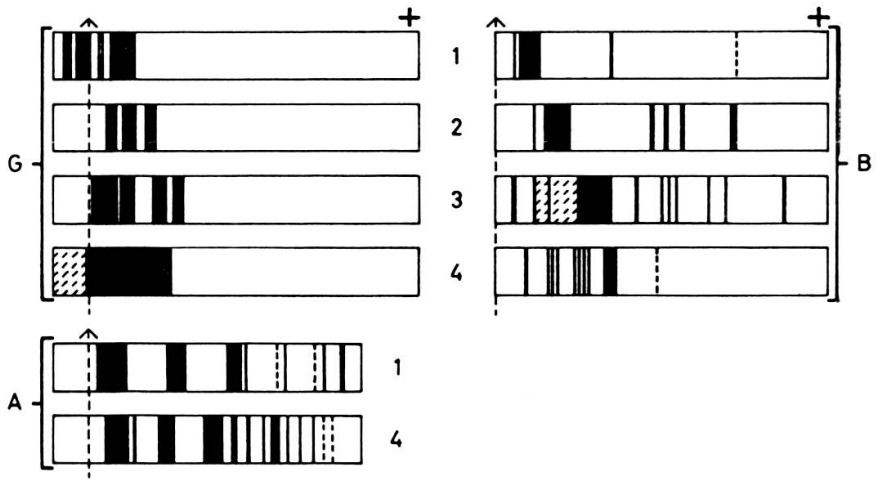

Fig. 12. — Diagrammes d'électrophorèses réalisées en gel de polyacrylamide et colorées par le noir amide d'extraits bruts (B) ou de solutions albuminiques (A) et globuliniques (G) des espèces *D. cayenensis* (1), *D. bulbifera* (2), *D. dumetorum* (3), *D. Preussii* (4).

En général, les fractions anodiques les plus mobiles sont absentes de l'extrait brut. Cela peut s'expliquer par une différence de concentration: l'extrait brut met en jeu 1600 γ de lyophilisat, la solution albuminique contient 500 γ d'albumines pures. Or le lyophilisat de l'extrait brut ne contient que 3 à 18 % de protéines suivant les espèces ce qui donne une solution albuminique au moins 2 fois plus riche en protéines considérées globalement que l'extrait brut et au moins 4 fois plus riche en albumines. A cet égard, l'extrait brut de *D. dumetorum* fait exception par l'existence de quelques fractions anodiques mobiles; or nous constatons qu'il est précisément et de beaucoup le plus riche en protéines (dosées par la méthode de Folin).

Une autre constatation est la condensation, après dialyse, des sept fractions très fines et contiguës des extraits bruts de *D. Preussii*. Nous ne les retrouvons ni chez les albumines, ni chez les gobulines, soit que d'autres, abondantes et situées au même niveau, les masquent, soit que la dialyse les ait modifiées.

Que pouvons-nous conclure des données fournies par les électrophorèses en polyacrylamide?

1. Qu'elles sont particulièrement intéressantes pour analyser les extraits bruts.
2. Que les diagrammes plus détaillés des albumines et globulines ne sont pas un apport négligeable et fournissent un important complément d'informations. Même si quelques altérations résultent de la dialyse et de la lyophilisation, elles jouent au même titre pour toutes les protéines en jeu; la comparaison d'espèce à espèce de telles protéines reste donc parfaitement valable.
3. Que les modalités d'extraction et d'isolement des protéines avant analyse sont d'une extrême importance et que les comparaisons ne peuvent avoir lieu que sur des extraits ou solutions protéiques ayant subi rigoureusement le même traitement.
4. Que la technique électrophorétique, elle-même, revêt une grande importance pour la révélation des bandes fines: ainsi la hauteur du gel tasseur relativement au volume de l'échantillon joue un rôle déterminant dans la révélation des bandes fines du *D. Preussii* (brut).

Tout ceci nous conduit à la conclusion que les électrophorèses en gel de polyacrylamide sont un précieux complément d'information mais ne permettent pas de supprimer tout le profit que l'on peut tirer des microélectrophorèses en gel d'agarose si parfaitement reproductibles et fournissant un milieu idéal pour les réactions enzymatiques.

La signification taxonomique sera exprimée dans un tableau et les données seront regroupées avec celles provenant d'autres sources.

V. CARACTÈRES DIVERS ET BILAN D'UNE EXTRACTION EXHAUSTIVE

Les extractions exhaustives sont réalisées selon une méthode rigoureusement normalisée. Le bilan d'une telle extraction ainsi que plusieurs caractères physico-chimiques des farines des espèces étudiées sont groupés dans le tableau 3.

Nous constatons que *D. bulbifera* (2), bien que le plus pauvre en azote total, est, avec *D. dumetorum* (3), l'espèce la plus riche en albumines et globulines (NaCl); c'est également celle dont la proportion d'azote solubilisable par les solvants mis en jeu est la plus forte (8,9% d'azote non extrait contre 20,29 et 31%); l'azote

manquant dans cette espèce, qui lui vaut son taux le plus bas d'azote total, correspond donc à l'azote insolubilisable. Ces particularités tendent à singulariser *D. bulbifera* (2). Quant à *D. dumetorum* (3), il se signale également par d'autres

TABLEAU 3

Bilan d'une extraction exhaustive et caractères divers des farines de D. cayenensis (1), D. bulbifera (2), D. dumetorum (3), D. Preussii (4).

	1	2	3	4
Aspect de la farine . .	brun foncé	brun rouge clair	brun gris	brun rouge
Lipides (CCl_4) % poids frais	6,65	4,41	—	6,65
N total en % du poids frais	3,4	1,8	2,6	2,3
Protéines (N × 6,25). .	21,3	11,3	16,3	14,4
(N % NT échantillon)				
N extrait par NaCl . .	33,0 %	63,3 %	69,6 %	29,4 %
N extrait par alcool 70°	0	0	0	0
N extrait par NaOH O,1N	35,3	27,8	10,4	41,4
N non extrait	31,7	8,9	20,0	29,2
Perte de poids par extraction en % échantillon	47,2	51,8	56,2	43,6
Extrait brut (1er extrait NaCl) poids de protéines (Folin) en % Poids de lyophilisat .	7,9	3,7	18,3	5,4
Aspect des extraits:				
NaCl	limpide	limpide	trouble (film blanc surnageant après centrifugat.)	limpide
alcool.	jaune + + +	incolore à rosé	jaune + +	jaune +
NaOH 1	madère + + +	madère + +	incolore trouble	madère +
NaOH 2	bordeaux + + +	bordeaux + +	jaune pâle	bordeaux +

caractères: tout d'abord par la richesse de ses extraits bruts en protéines ou, tout au moins, en substances à caractère Folin+(protéines, guanine, xanthine, tyrosine...) en outre par la couleur de sa farine, la turbidité des extraits aussi bien salins que sodiques. Or l'analyse protéique a précisément mis en relief l'originalité tantôt de l'une tantôt de l'autre de ces deux espèces.

Soulignons une dernière particularité qui distingue *D. dumetorum* de *D. bulbifera :* l'extraction maximum d'azote présentée par *D. bulbifera* (2) ne correspond pas à la plus grande perte de poids qui est celle de *D. dumetorum* (3), ce qui signifie que *D. dumetorum* est plus riche que *D. bulbifera* en substances solubles non azotées.

VI. REGROUPEMENT ET INTERPRETATION DES DONNEES

Les données de toutes provenances vont être maintenant utilisées comme caractères unités (unit characters) qualitatifs ou quantitatifs et, pour cela, vont tout d'abord être situées dans une table ($t \times n$) laquelle juge les t unités taxonomiques opérationnelles (UTOs ou OTUs) (ici les quatre espèces de dioscorées) sur les n caractères issus de nos diverses analyses.

De là seront tirées les tables de similitudes ($t \times t$) qui comparent chaque taxon avec chaque autre. Enfin, sera réalisée l'analyse de groupe (cluster analysis) qui conduira à établir un dendrogramme.

Avant d'arriver au groupement global de toutes les données, nous sommes curieux de considérer isolément les groupements partiels issus de chaque type d'analyse afin de disposer d'un moyen de jugement et de comparaison des hiérarchies qu'il conviendrait d'accorder aux diverses sources de données.

1. Caractères fournis par l'analyse électrophorétique en gel d'agarose

Les données qualitatives découlent de la présence ou l'absence d'une fraction protéique quelconque (NA) ou enzymatique particulière en chaque point du parcours où au moins une fraction d'un des quatre taxons s'est révélée. Cette table ($t \times n$) est dressée à partir du tableau 1.

Les données quantitatives proviennent du tableau 2. La table ($t \times n$) est alors ainsi établie: quand un chiffre tranche nettement sur les autres, la question est posée pour qu'il soit +. Si les trois autres chiffres méritent, en outre, d'être rapprochés, la question est à nouveau posée pour qu'ils répondent oui à leur tour. Si le chiffre différent ne mérite pas d'être mis en relief et que les trois autres méritent le rapprochement la question est posée pour que ces trois chiffres répondent +. Toutes les données utilisées sont choisies de façon à supprimer la répétition d'un même phénomène; mais si deux séries de valeurs qui, à priori, sembleraient logiquement liées sont constatées indépendantes, par l'intervention de facteurs plus ou moins explicites, les deux séries seront maintenues. C'est ainsi que l'on utilisera les intensités des fractions albuminiques enzymatiques dans certains cas particulièrement marquants, à la fois en référence au poids de protéine et en référence à la coloration au noir amide, alors que ces deux valeurs pourraient paraître, à première vue, liées.

Le coefficient de similitude « S » est établi selon la formule de Sneath. Pour les données qualitatives:

$$S = \frac{\text{nombre de paires de bandes semblables} \times 100}{\text{nombre de paires de bandes semblables} + \text{nombre de bandes différentes}}$$

autrement dit:

$$S = \frac{\Sigma(++) \times 100}{\Sigma(++) + \Sigma(+-)}$$

Pour les données quantitatives:

$$S = \frac{\text{nombres de faits } (+) \text{ partagés entre les 2 UTOs} \times 100}{\text{n. de faits } (+) \text{ partagés entre les 2 UTOs} + \text{n. de faits } (+) \text{ dans l'un et } (-) \text{ dans l'autre}}$$

autrement dit:

$$S = \frac{\Sigma(++) \times 100}{\Sigma(++) + \Sigma(+-)}$$

Les tables (t×n) ont ainsi été établies à partir des données provenant: pour le tableau 4, des électrophorèses en agarose; pour le tableau 5, de celles issues de la migration en acrylamide (fig. 12); pour le tableau 6, des résultats d'analyses et d'extractions exhaustives figurées dans le tableau 3.

TABLEAU 4

Table (t×n) : comparaison des taxons d'après les 108 (61+47) caractères fournis par l'analyse microélectrophorétique en gel d'agarose.

Désignation des taxons : 1=D. cayenensis, 2=D. bulbifera, 3=D. dumetorum, 4=D. Preussii.
Abréviations : NA=noir amide, P=phosphatases, Perox=peroxydases, E=estérases, MDH=malique deshydrogénases, AT=activité enzymatique totale, B=extrait brut, A=albumines, G=globulines.

1) données qualitatives

distances de migration en mm		1	2	3	4		mm	1	2	3	4
NA (B)	−12−11	+	−	−	−	Perox (G)	−9	+	−	−	−
	−4	−	−	+	+		−6	−	−	−	+
	−1−0	+	+	−	−		1	+	−	−	+
	2 à 5	−	−	+	+		7	+	−	−	+
	5 à 8	+	+	−	−						
						P (B)	10	+	+	+	+
NA (A)	−18−16	−	−	+	+						
	−11	+	−	+	−	P (A)	13 à 16	+	+	+	+
	−8	+	−	−	+		25	−	−	−	+
	−4	−	−	+	+						
	−2	+	−	+	+	P (G)	0	−	−	−	+
	2	+	−	−	+		5	+	−	−	−
	5	−	+	+	+		10	+	−	+	−
	8	+	−	+	+		13	−	−	−	+
	12	−	−	+	+						

1) Données qualitatives *(suite)*

		1	2	3	4
	17	+	−	+	+
	22	+	+	+	+
	26	+	+	−	−
NA (G)	−12	+	−	−	−
	−8	+	−	−	−
	0	+	−	−	+
	5 à 8	−	−	+	+
Perox (B)	−8	+	−	−	−
	−5	−	−	+	+
	−3	−	+	+	−
	0	−	+	+	+
	3	−	−	−	+
	7	+	+	−	−
Perox (A)	−16	+	−	−	−
	−12	+	−	−	+
	−9	+	−	−	−
	−6	+	+	+	−
	0	−	+	−	+
	7	+	+	+	+
	10	+	−	−	−
	20	−	+	−	−

		1	2	3	4
E (B)	−3	+	−	+	−
	0	−	+	−	−
	4	+	−	−	−
	7	−	−	−	+
	11	−	+	+	−
	15	−	−	−	+
E (A)	−3	−	−	−	+
	7 à 9	+	−	+	+
	11	−	−	+	−
	15	−	+	−	−
E (G)	20	+	−	−	+
MDH (B)	10	+	−	+	−
	18	−	−	+	+
MDH (A)	7	−	−	+	−
	18	−	−	+	−

2) données quantitatives

	1	2	3	4
NA (B) < 20	−	−	+	−
NA (A) < 30	+	+	−	−
de 85 à 95	−	−	+	+
Perox (A) < 100	−	−	+	−
Perox/NA (B) < 1	−	−	+	−
de 2 à 3	+	−	−	+
⩾ 5	−	+	−	−
Perox/NA < 2	−	−	+	+
= 5	+	−	−	−
> 20	−	+	−	−
P (B) 50 à 60	+	+	+	+
P (A) 80 à 90	+	+	+	+
P/NA (B) < 1,5	+	−	+	+
⩾ 3,5	−	+	−	−
P/NA (A) ⩽ 1	−	−	+	+
3 à 4	+	−	−	−
⩾ 14	−	+	−	−
E/NA (B) < 1	+	−	+	+
E/NA (A) > 5	−	+	−	−
MDH/NA (B) > 0	−	−	+	−
MDH/NA (A) > 0	−	−	+	−
AT/NA (B) < 1,5	−	−	+	−
= 3,7	+	−	−	+
> 9	−	+	−	−
AT/NA (A) de 2 à 3	−	−	+	+
> 40	−	+	−	−

	1	2	3	4
$\frac{\text{Perox/NA (A)}}{\text{Perox/NA (B)}} < 1$	−	−	−	+
$\frac{\text{P/NA (A)}}{\text{P/NA (B)}} < 1$	−	−	−	+
$\frac{\text{E/NA (A)}}{\text{E/NA (B)}} \geqslant 6$	−	+	−	−
$\frac{\text{AT/NA (A)}}{\text{AT/NA (B)}} < 1$	−	−	−	+
de 1 à 3	+	−	+	−
> 5	−	+	−	−
Perox/AT (B) < 0,3	−	−	+	−
Perox/AT (A) ⩽ 0,3	−	−	+	−
= 0,6	+	+	−	+
P/AT (B) 0,3 à 0,5	+	+	+	+
P/AT (A) 0,3 à 0,4	+	+	+	+
Perox/P (B) < 0,5	−	−	+	−
= 1,4 à 2	+	+	−	+
Perox/P (A) < 1	−	−	+	−
1,6 à 2,1	+	+	−	+
Perox/E (B) < 2	−	−	+	+
> 5	+	+	−	−
Perox/E (A) ⩽ 2	−	−	+	−
4 à 9	+	+	−	+
AT/NA (G) > 1	+	−	−	+

2. Caractères fournis par l'analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide

Tableau 5

Table (t × n) : comparaison des taxons d'après les 30 caractères fournis par l'analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide.

Désignation des taxons : 1 = D. cayenensis, 2 = D. bulbifera, 3 = D. dumetorum, 4 = D. Preussii, G = Globulines, B = extraits bruts

Distance de migration en mm	1	2	3	4	Distance de migration en mm	1	2	3	4
(B) 3–4	+	–	+	–	4 bandes de 17 à 20	–	–	–	+
5 à 9 *	+	–	–	–	17 à 24 *	–	–	+	–
6	+	–	–	+	24	+	–	+	+
8	+	+	+	–	32	–	+	–	+
10 à 15 *	–	+	–	–	34	–	–	+	–
11	–	+	+	+	36	–	+	+	–
12	–	+	–	+	38	–	+	+	–
13	–	+	–	+	45	–	–	+	–
16	–	–	–	+	49–50	+	+	+	–
3 bandes de 11 à 14	–	–	–	+	56	–	–	+	–
17	–	–	–	+	(G) –4 à 0	+	–	–	+
18	–	–	+	+	–4 à 0 (2 bandes)	+	–	–	–
19	–	–	+	+	3	+	–	+	+
					4 à 10	+	+	+	+
					12	–	+	–	+
					15	–	–	+	+
					20	–	–	+	–

* pour faire ressortir l'originalité de la tache compacte, celle-ci est indiquée d'abord, ensuite les bandes fines à ce niveau sont comptées comme + pour l'espèce à tache compacte.

3. Caracteres divers

Les tableaux de similitude (t × t) relatifs à chacune des tables (n × t) précédentes peuvent être comparés entre eux dans le tableau 7. Précisons que les valeurs figurant dans le tableau global qui cumule toutes les données recueillies ont été formées par addition des numérateurs entre eux et des dénominateurs entre eux. Exemple: la comparaison des taxons 1, 2 donne partiellement:

$$\frac{9 \times 100}{9 + 33} ; \frac{10 \times 100}{10 + 17} ; \frac{3 \times 100}{3 + 15} ; \frac{2 \times 100}{2 + 9} \quad \text{donc globalement}$$

$$\frac{(9+10+3+2)\,100}{9 + 33 + 10 + 17 + 3 + 15 + 2 + 9} = 24.$$

TABLEAU 6

Table (t × n) : jugement des taxons d'après les 15 caractères fournis par la farine et par le bilan d'une extraction exhaustive.

1 = D. cayenensis, 2 = D. bulbifera. 3 = D. dumetorum, 4 = D. Preussii. NT = azote total.

	1	2	3	4
NT de la farine < 2	−	+	−	−
de 2,3 à 2,6	−	−	+	+
> 3	+	−	−	−
N non extractible < 10	−	+	−	−
de 29 à 32	+	−	−	+
N extrait par NaCl < 35	+	−	−	+
> 60	−	+	+	−
lipides 6,6 %	+	−	−	+
teneur des liyophilisats d'extraits bruts en protéines et substances folin + > 18 %	−	−	+	−
de 3 à 8 %	+	+	−	+
solutions salines troubles	−	−	+	−
solutions alcooliques incolores	−	+	−	−
solutions alcooliques jaunes	+	−	+	+
solutions sodiques troubles	−	−	+	−
solutions sodiques madères	+	+	−	+

Pour dégager une hiérarchie dans la signification des critères étudiés, comparons les résultats partiels entre eux et avec le résultat final qui regroupe l'ensemble des caractères.

Nous constatons sur la 2ème partie du tableau 7, où les diagrammes schématiques sont arrangés de manière à faire voisiner les taxons similaires, que l'ordre partiel des données agarose groupées (4—1—3—2) est le même que l'ordre final. L'ordre des caractères divers est le même que celui des caractères quantitatifs agarose (4—1—2—3) et assez voisin des précédents. Quant aux données qualitatives fournies par la distance de migration électrophorétique, elles conduisent à un arrangement presque identique avec chacune des deux techniques (3—4—2—1 et 3—4—1—2) et ceci malgré la faible quantité des données acrylamides due à la parcimonie du matériel disponible pour certaines espèces ce qui ne permit pas d'exploiter les diagrammes albuminiques qui sont justement les plus complexes. Mais cet arrangement est quelque peu différent de l'arrangement final.

Ceci montre que, s'il convient d'incorporer les données qualitatives fournies par la vitesse de migration électrophorétique des fractions protéiques dans l'ensemble des caractères, elles ne suffisent pas à elles seules à donner un reflet fidèle des affinités génétiques. Il est indispensable d'y adjoindre les données qualitatives et quantitatives apportées par la connaissance des caractères enzymatiques de certaines de ces protéines et de compléter tout cela par les caractères divers de la farine. L'examen de

TABLEAU 7

Tableaux de similitudes ($t \times t$) établis à partir des tables ($n \times t$) des tableaux 4, 5, 6.

agarose: caractères qualitatifs (61)

	1	2	3	4
1		21	26	28
2			25	16
3				41
4				

agarose: caractères quantitatifs (47)

	1	2	3	4
1		37	20	50
2			10	25
3				32
4				

agarose: caractères groupés (108)

	1	2	3	4
1		28	24	36
2			17	20
3				36
4				

acrylamide: caractères qualitatifs (31)

	1	2	3	4
1		17	27	23
2			26	27
3				25
4				

caractères divers (15)

	1	2	3	4
1		18	9	75
2			9	18
3				18
4				

groupement des 154 caractères

	1	2	3	4
1		24	23	36
2			18	21
3				32
4				

agarose: caractères qualitatifs

	3	4	1	2
3		41	26	25
4			28	16
1				21
2				

agarose: caractères quantitatifs

	4	1	2	3
4		50	25	32
1			37	20
2				10
3				

agarose: caractères groupés

	4	1	3	2
4		36	36	20
1			24	28
3				17
2				

acrylamide: caractères qualitatifs

	3	4	2	1
3		25	26	27
4			27	23
2				17
1				

caractères divers

	4	1	2	3
4		75	18	18
1			18	9
2				9
3				

groupement des 154 caractères

	4	1	3	2
4		36	32	21
1			23	24
3				18
2				

100% ⩾50% 30 à 50% 20 à 30% 10 à 20% ⩽10%

tous les tableaux partiels permet de relever deux résultats assez constants: Le rapprochement presque toujours maximum entre *D. cayenensis* et *D. Preussii* (1—4) (à l'exception des données acryl) et l'éloignement souvent maximum ou submaximum de *D. bulbifera* et *D. dumetorum* (2—3).

VII. CONCLUSIONS

Les conclusions de ce premier travail s'établissent sur les deux buts qui étaient poursuivis, l'un pratique, l'autre théorique:

1. Poser les structures des analyses qui suivront et qui, pour permettre les comparaisons à tous les échelons et à toutes les époques, doivent se dérouler selon

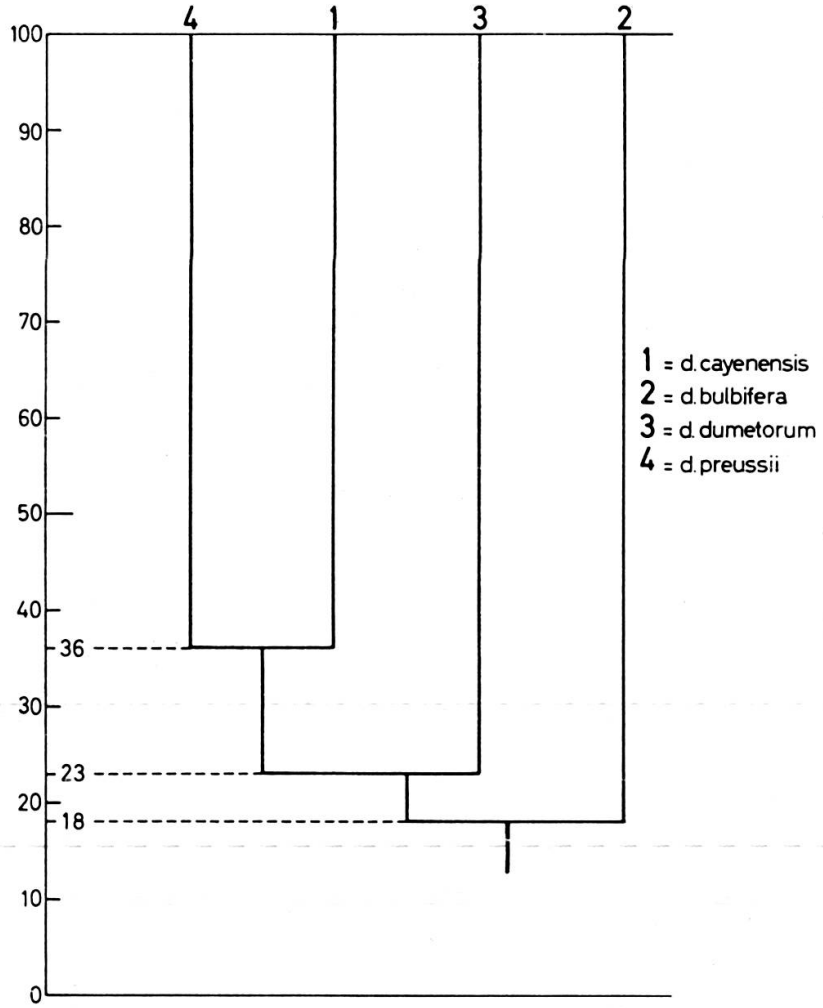

FIG. 13. — Dendrogramme représentant une hiérarchie hypothétique entre les quatre taxons.

un processus applicable à tous les cas, rigoureusement normalisé et répondant aux impératifs que nous posons:

— permettre la révélation du plus grand nombre de caractères possibles;

— supprimer toute ambiguité et incertitude d'interprétation par élimination de tout facteur exogène susceptible de modifier les données; pour cela la connaissance approfondie des conséquences de chaque particularité technique était nécessaire.

Nous avons ainsi établi un protocole rigoureusement reproductible et capable d'être appliqué à tous les types de graines, même à celles disponibles en très petites quantités (quelques grammes suffisent). Aucun détail technique n'est jugé négligeable, depuis la méthode de mouture, sa durée, la température, le nombre d'heures avant l'extraction jusqu'aux modalités de dialyse et, bien sûr d'électrophorèse.

Cette mise au point était nécessaire pour permettre un travail à grande échelle avec tous les taxons qui seront étudiés ultérieurement.

2. Le deuxième but de ce travail était de comparer entre elles les quatre espèces étudiées ici. Le dendrogramme (figure 13) (ou plutôt minidendrogramme en raison du faible nombre d'OTUs étudié dans ce premier travail) ne permet pas encore de dégager des groupes.

Appartenant à un même genre, nous sommes surpris de constater de si faibles cœfficients de similitude. Le plus élevé n'est que de 36 % (en résultat global). Nous sommes en présence d'un étrange genre et ces premiers résultats soulignent l'originalité, pour ne pas dire l'indépendance de ses membres. Nous pensons néanmoins pouvoir dégager quelques groupements lorsque ces premières données seront complétées par celles concernant les 8 taxons apparentés dont nous poursuivons l'étude.

Actuellement, de ces 4 espèces, les plus proches sont *D. Preussi* et *D. cayenensis*, la plus éloignée est *D. bulbifera*, suivie de près par *D. dumetorum*, ces deux espèces n'ayant que peu d'affinités entre elles (18 %).

BIBLIOGRAPHIE

DAVIS, B. J. (1964). — Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121: 404-427.

FRANCOIS, J., M. RABAEY et L. EVENS (1958). — Agar microelectrophoresis of the aqueous humor. *A.M.A.Arch. ophtalmol.*, 59: 692-702.

LOWRY, O. H., N. J. ROSENBROUGH, A. L. FARR et R. J. RANDALL (1951). — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.

MIEGE, J. (1968). — Dioscoreaceae *in* J. Hutchinson, J. M. Dalziel et F. N. Hepper, *Flora of West Trop. Africa. III*, 1: 144-154.

MIEGE, M. N. (1970). — Etude des protéines des graines d'une légumineuse: Lablab niger Medik. *Arch. Sc. Genève*, 23, 1: 75-150.

ORNSTEIN, L. et B. J. DAVIS (1962). — Disc electrophoresis, Preprint by Distillation Products Industries (Eastman Kodak Co.), Rochester, N.Y.

SNEATH, P. H. A. et R. R. SOKAL (1962). — Numerical taxonomy. *Nature*, 193: 855-860.

URIEL, J. (1958). — Interprétation quantitative des résultats après électrophorèse en gélose I. Considérations générales, application à l'étude des constituants protéiques isolés. *Clin. Chim. Acta*, 3: 234-247.

WIEME, R. J. (1965). — Agar gel electrophoresis. 425 pp. Elsevier Publishing Company Amsterdam, London, New York.